

No English title available.

Patent Number: ☐ DE19710496
Publication date: 1998-09-17
Inventor(s): ENDL JOSEF DR (DE); FESSELE SABINE (DE); STAHL PETER DR (DE); DREISBUSCH BARBARA (DE)
Applicant(s): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE)
Requested Patent: ☐ EP0972199 (WO9840745)
Application Number: DE19971010496 19970313
Priority Number(s): DE19971010496 19970313
IPC Classification: C12N11/00; C12N5/00; C12Q1/02; G01N33/50; G01N33/53; A61K39/395; G01N33/564; G01N33/574; G01N33/66
EC Classification: C12N5/06B10B, G01N33/569H2
Equivalents: AU7035198, JP2002500627T, ☐ WO9840745

Abstract

The invention concerns a method of producing a cell population enriched with antigen-specific T-cells, the use of this cell population in diagnosis and for producing a therapeutic agent, and a test kit for a method of detecting the antigen-specific reactivity of a T-cell population.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

THIS PAGE BLANK (USPTO)



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 10 496 A 1**

⑤ Int. Cl.⁶:
C 12 N 11/00
C 12 N 5/00
C 12 Q 1/02
G 01 N 33/50
G 01 N 33/53
A 61 K 39/395
// G01N 33/564,
33/574,33/66

⑳ Aktenzeichen: 197 10 496.7
㉔ Anmeldetag: 13. 3. 97
㉕ Offenlegungstag: 17. 9. 98

DE 197 10 496 A 1

㉑ Anmelder:
Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim,
DE

㉒ Vertreter:
H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

㉓ Erfinder:
Dreisbusch, Barbara, 82377 Penzberg, DE; Endl,
Josef, Dr., 82362 Weilheim, DE; Stahl, Peter, Dr.,
82347 Bernried, DE; Fessele, Sabine, 81925
München, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤4 Verfahren zum Nachweis antigenspezifischer T-Zellen nach Anreicherung von mononukleären Zellpopulationen
- ⑤7 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer an antigenspezifischen T-Zellen angereicherten Zellpopulation, die Verwendung dieser Zellpopulation in der Diagnostik und zur Herstellung eines therapeutischen Mittels sowie einen Testkit für ein Verfahren zum Nachweis der antigenspezifischen Reaktivität einer T-Zellpopulation.

DE 197 10 496 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer an antigenspezifischen T-Zellen angereicherten T-Zellpopulation, die Verwendung dieser T-Zellpopulation in der Diagnostik und zur Herstellung eines therapeutischen Mittels sowie einen Testkit für ein Verfahren zum Nachweis der antigenspezifischen Aktivierung einer T-Zellpopulation.

Das Immunsystem der Vertebraten ist ein komplexes System, in dem eine Vielzahl von Molekülen und Zellen in feinabgestimmten Reaktionen zusammenwirken. Seine vorrangige Aufgabe ist es, den Organismus vor Mikroorganismen, wie Viren, Bakterien und anderen Parasiten zu schützen. Dazu haben sich im Laufe der Entwicklung zwei unterschiedliche Systeme herausgebildet, die sich in kommunizierender Weise zur Sicherstellung dieser Aufgabe ergänzen.

Man unterscheidet das Erkennungssystem der humoralen Immunantwort, welches aus löslichen Proteinen, den Antikörpern besteht, die in Plasmazellen hergestellt werden, und der zellulären Immunantwort, bei der Zellen, die fremde Strukturen an ihren Oberflächen aufweisen, von T-Lymphozyten erkannt und aus dem Organismus entfernt werden. Darüber hinaus stimulieren die T-Lymphozyten die humorale Immunantwort, indem sie mit den B-Zellen, den Vorläufern der Plasma-Zellen, wechselwirken.

Bei diesen Vorgängen muß das Immunsystem eigene Strukturen, d. h. Zellen des eigenen Organismus von fremden Bestandteilen und Zellen, die dem Organismus schaden könnten, unterscheiden. Man bezeichnet die körpereigenen Strukturen auch als "Selbst" und fremde Strukturen als "Nicht-Selbst".

Bei Störungen dieses "Selbsterkennungsmechanismus" kann es zu Erkrankungen, wie Allergien oder Autoimmunkrankheiten kommen.

Ein Beispiel für eine Erkrankung, bei der ein Autoimmundefekt als Ursache vermutet wird, ist der insulinabhängige Diabetes mellitus (IDDM). Hierbei kommt es zu einer T-Lymphozytenvermittelten Zerstörung der insulinproduzierenden beta-Zellen des Pankreas. Man nimmt an, daß eine Autoimmunität gegen Glutamatdecarboxylase (GAD) die T-Zellantwort für andere beta-Zellantigene vermittelt. Das GAD-Antigen, welches in den beta-Zellen enthalten ist, führt zu einer proliferativen T-Zellantwort mit einem gleichzeitigen Einsetzen einer Insulinitis und im folgenden durch Zusammenwirken verschiedener Vorgänge zur Zerstörung der beta-Zellen des Pankreas.

Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, daß eine Anti-GAD-Immunantwort eine kritische Rolle beim Krankheitsbild des IDDM spielt. Der Nachweis von autoraktiven T-Zellen, die durch das GAD-Antigen stimuliert werden können, stellt ein Verfahren zur Verfügung mit dessen Hilfe die Entstehung oder das Vorliegen von IDDM diagnostiziert werden kann. Durch in vitro Stimulierung der Proliferation oder der Expression von Aktivierungsmarkern oder der Cytokinfreisetzung von peripheren Blutlymphozyten mit einem oder mehreren Autoantigenen in einer Blutprobe kann dieser Nachweis durchgeführt werden.

Ein Problem bei diesem Nachweisverfahren stellt die geringe Frequenz der autoantigenspezifischen T-Zellen im peripheren Blut dar, die mit einer Häufigkeit von nur 1 in 10^5 bis 1 in 10^6 der gesamten T-Zellen vorliegen. Zusätzlich kann oftmals eine Autostimulation, die als sogenannte "autologous mixed lymphocyte reaction" bezeichnet wird, zu einem hohen Hintergrundsignal führen, das die Nachweispmpfindlichkeit und -zuverlässigkeit entscheidend beeinträchtigt.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb die Nachteile des Standes der Technik mindestens teilweise zu beseitigen und insbesondere die Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit von T-Zellproliferationstests zu erhöhen.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird durch ein Verfahren zur Herstellung einer an antigenspezifischen T-Zellen angereicherten Zellpopulation gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man aus einer mononukleären Population von Zellen durch spezifische Abreicherungs-schritte naive T-Zellen und eine Subpopulation von B-, T- oder/und NK-Zellen, die eine unspezifische Aktivierung oder/und Proliferation bewirken, entfernt.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß durch Abreicherung von naiven T-Zellen und einer mononukleären Subpopulation von Lymphozyten, die eine unspezifische Aktivierung oder/und Proliferation von T-Zellen bewirkt und insbesondere eine Subpopulation von B-, T- und NK- (natürliche Killer) Zellen umfaßt, nicht nur die Frequenz der antigenspezifischen T-Zellen erhöht, sondern auch die Autostimulationsreaktion zumindest weitgehend verhindert werden kann.

Im Gegensatz dazu wurde gefunden, daß eine Gewinnung von antigenspezifischen T-Zellen nicht durch gezielte "positive" Anreicherungsschritte möglich war, da hierbei stets eine ganz erhebliche Zunahme der Autostimulation eintritt. Überraschend und neu ist, daß lediglich die Abreicherung gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren von naiven T-Zellen und einer Subpopulation von B-, T- oder/und NK-Zellen zu der gewünschten antigenspezifischen Zellpopulation führt.

Als besonders günstig erwies sich die Entfernung unerwünschter Zellen durch die erfindungsgemäße Kombination von Abreicherungs-schritten unter Verwendung von Bindemolekülen, z. B. Antikörpern, die spezifisch an charakteristische Oberflächenstrukturen der unerwünschten Zellen binden können. Von großem Vorteil ist dabei, daß unerwünschte Zellen mittels chromatographischer Trennverfahren entfernt werden können, wenn man auf einem Träger immobilisierte Bindemoleküle einsetzt, an die die erwünschten antigenspezifischen T-Zellen nicht gebunden werden. Auf diese Weise kommen die antigenspezifischen T-Zellen nicht in Kontakt mit damit bindelähigen Molekülen, wodurch eine unspezifische Autostimulation verhindert wird.

Überraschend war insbesondere, daß gerade die erfindungsgemäße Kombination einer Abreicherung von naiven T-Zellen und einer Subpopulation von B-, T- oder/und NK-Zellen zu einem hohen Grad der Anreicherung von antigenspezifischen T-Zellen führte, ohne daß gleichzeitig eine nachteilige Autostimulation eintrat.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens können geeignete Oberflächendeterminanten der abzureichernden Zellen bestimmt werden und geeignete dagegen gerichtete Bindemoleküle, z. B. Antikörper verwendet werden. Als Antikörper werden vorzugsweise monoklonale Antikörper oder Fragmente davon eingesetzt. Es können jedoch auch polyclonale Antiseren mit ausreichender Spezifität verwendet werden.

Vorzugsweise verwendet man zur Entfernung der naiven T-Zellen Antikörper gegen die Oberflächendeterminanten CD62L (Reinherz, E. L. et al., 1982, J. Immunol. 184, 1508) oder/und CD45RA (Morimoto C. et al., 1985, J. Immunol. 184, 1508).

Zur Entfernung einer Subpopulation von B-, T- oder/und NK-Zellen werden vorzugsweise Antikörper gegen die Ober-

flächendeterminante CD39 verwendet (Kansas, G. S. et al., 1991, J. Immunol. 146, 2235).

Das Verfahren der Erfindung kann so angepaßt werden, daß jeweils gewünschte Zellpopulationen als Ausgangsmaterial verwendet werden können. Ein bevorzugtes Ausgangsmaterial sind periphere Blutlymphozyten, besonders bevorzugt sind periphere mononukleäre Zellen, z. B. aus Blut. Durch das Verfahren wird vorzugsweise eine Zellpopulation, die mit Memory-T-Zellen und in vivo präaktivierten T-Zellen angereichert ist, gewonnen.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung eine angereicherte Zellpopulation, die erhältlich ist durch das oben dargestellte Verfahren. In einer bevorzugten Ausführungsform, ist der Gehalt der Zellpopulation $\geq 80\%$ an Memory-T-Zellen und in vivo präaktivierten T-Zellen. Besonders bevorzugt ist der Gehalt $\geq 90\%$.

Der Gehalt an naiven T-Zellen sowie an der störenden Subpopulation von B-, T-, oder/und NK-Zellen wird durch das erfindungsgemäße Verfahren verringert. Vorzugsweise enthält die Zellpopulation einen Gehalt an naiven T-Zellen von $\leq 10\%$. Der Gehalt der störenden Subpopulation von B-, T- oder/und NK-Zellen in der Zellpopulation beträgt vorzugsweise $\leq 20\%$ des Ausgangswerts.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung der nach dem beschriebenen Verfahren erhältlichen Zellpopulation in der Diagnostik, vorzugsweise in einem Verfahren zum Nachweis der T-Zellreaktion gegen ein spezifisches Antigen, bei dem es sich um ein Autoantigen, Tumorantigen oder/und Pathogen oder ein Fragment davon handeln kann. Besonders bevorzugt ist das Antigen ein Autoantigen oder ein Fragment davon, das zum Nachweis von Autoimmunerkrankungen oder einer Prädisposition dafür eingesetzt werden kann. Ein Beispiel hierfür ist der Nachweis von IDDM, der über spezifische Autoantigene wie humane GAD (Baekkeskov S. et al., 1987, J. Clin. Invest., 79, 926) oder IA-2 (Payton, M. A., et al., 1995, J. Clin. Invest., 96, 1506) erfolgen kann. Am meisten bevorzugt ist humane GAD oder ein Fragment davon, z. B. ein Teilpeptid wie es in der deutschen Patentanmeldung Nr. P 44 01 629.8 beschrieben ist.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung der Zellpopulation in einem Verfahren zur Kontrolle eines Vakzinierungserfolges, z. B. bei der Vakzinierung gegen ein Pathogen, wie beispielsweise Tetanus.

In noch einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung der Zellpopulation in einem Verfahren zur Kontrolle der Verringerung der antigenspezifischen T-Zellen. Allgemein kann ein solches Verfahren zum Therapiemonitoring eingesetzt werden. Insbesondere nach therapeutischen Maßnahmen, wie beispielsweise einer Anergieinduktion oder Depletion, z. B. durch Antikörper vermittelte Komplementlyse, ist ein solches Kontrollverfahren einsetzbar.

Das Antigen wird in dem Verfahren in einer geeigneten Form eingesetzt, vorzugsweise wird es in einer hochgereinigten Form verwendet. Das Antigen kann auch chemisch modifiziert werden, um eine erhöhte Aufnahme in die antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen) zu erzielen. Besonders bevorzugt wird das Antigen glykosyliert, z. B. mannosyliert, da hierdurch eine erhöhte Aufnahme über den Mannose-Rezeptor, der vor allem auf dendritischen Zellen exprimiert wird, vermittelt wird (Sallusto, F. et al., 1995, J. Exp. Med., 182, 389). Besonders bevorzugt wird das Antigen als Immunkomplex gebunden an einen Antikörper oder an ein Antikörperfragment verwendet, da die Antigenmenge auf diese Weise um einen Faktor von bis zu 10 verringert werden kann bzw. das Maximum der Aktivierung erhöht werden kann.

Der Antikörper kann jeder geeignete polyklonale oder monoklonale Antikörper sein. Es können aber auch Komplexe aus Antigen und Antikörperfragmenten verwendet werden. Vorzugsweise ist der Antikörper ein humaner Antikörper.

Alternativ zur Verwendung von vorgefertigten Immunkomplexen können in dem beschriebenen Verfahren auch Humansenen verwendet werden, die bereits Antikörper enthalten, welche gegen das relevante Antigen gerichtet sind, wie z. B. Autoantikörperpositive Seren von Patienten mit Autoimmunerkrankungen oder Seren von Personen mit Antikörpern gegen Pathogene.

Die erfindungsgemäße T-Zellpopulation kann auch zur Herstellung eines therapeutischen Mittels eingesetzt werden, z. B. eines Mittels für die Gentherapie. Hierzu wird die gewünschte T-Zellpopulation in präparativem Maßstab gewonnen und kann dann in vitro den im Rahmen von gentherapeutischen Verfahren üblichen Behandlungsschritten unterzogen werden.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung einen Testkit für ein Verfahren zum Nachweis der antigenspezifischen Reaktivität von T-Zellen, umfassend ein Reagenz zur Entfernung von naiven T-Zellen, ein Reagenz zur Entfernung einer Subpopulation von B-, T- oder/und NK-Zellen, die eine unspezifische Aktivierung oder/und Proliferation bewirkt, und Reagenzien zur Durchführung eines Assays zum Nachweis antigenspezifischer T-Zellen.

Vorzugsweise enthält der Testkit als Reagenz zur Entfernung von naiven T-Zellen Antikörper gegen CD45RA oder/und L-Selektin (CD62L). Zur Entfernung der Subpopulation von B-, T- oder/und NK-Zellen, die eine unspezifische Aktivierung oder/und Proliferation bewirken, enthält der Testkit vorzugsweise als Reagenz Antikörper gegen CD39. Als Reagenzien für einen T-Zellassay enthält der Testkit jeweils die entsprechenden Autoantigene, Tumorantigene oder/und Pathogene bzw. Fragmente davon. Die Reagenzien liegen in einer geeigneten Form vor, beispielsweise als Lösung, Suspension oder Lyophilisat und sie können durch geeignete Puffer oder Lösungen rekonstituiert werden.

Besonders bevorzugt enthält der Testkit das humane Autoantigen GAD oder/und Fragmente davon. Am meisten bevorzugt liegt das GAD-Antigen im Komplex mit einem Antikörper vor.

Vorzugsweise ist der Antikörper ein humaner Antikörper gegen GAD. Beispiele für geeignete Antikörper sind die MICA3- oder/und MICA4-Antikörper (Richter, W. et al., 1992, PNAS 89, 8467).

In noch einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis von antigenspezifischen T-Zellen, insbesondere von autoantigenspezifischen humanen T-Zellen, wobei man eine zu testende Zellpopulation mit einem Immunkomplex in Kontakt bringt, der das betreffende Antigen gebunden an einen dagegen gerichteten Antikörper, insbesondere an einen humanen Antikörper umfaßt, und anschließend die antigenspezifische Reaktivität der T-Zellpopulation bestimmt.

Zur Erläuterung der Erfindung dienen die folgenden Beispiele und Abbildung. Abb. 1 zeigt die Stimulation der T-Zelllinie 40/2#38 (ICL 40/2#38) durch freie bzw. durch mit MICA 4 komplexierte GAD.

Beispiele

Beispiel 1

5 Gewinnung von aktivierten bzw. Memory-T-Zellen durch positive Anreicherung

1.1 Einleitung

10 Zur Anreicherung aktivierter T-Zellen bzw. Memory-T-Zellen wurden periphere mononukleäre Zellen (PBMNC) mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern markiert, die gegen Oberflächenantigene gerichtet waren, welche auf aktivierten Lymphozyten bzw. Memory-T-Zellen exprimiert werden. Die markierten Zellen wurden in einem zweiten Schritt mit magnetisierbaren Microbeads markiert und über einen Magneten von den nicht markierten Zellen abgetrennt. Die nicht zurückgehaltene Zellfraktion (Negativfraktion) wurde aufgefangen. Nach dem Entfernen des Magneten wurde auch die immobilisierte Fraktion durch Waschen der Säule gesammelt (Positivfraktion). Um den Effekt der Zellanreicherung
15 messen zu können, wurde ein Stimulationstest mit Tetanustoxoid (TT) als Antigen durchgeführt.

1.2 Versuchsdurchführung

20 Die folgenden Antikörper wurden evaluiert:

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Monoklonale Antikörper gegen	Spezifität	Literatur/Herkunft	
CD 25	aktivierte Lymphozyten	Urdal, D. L. et al., 1984, PNAS, 81, 6481	5 10
CD 39	aktivierte Lymphozyten und NK-Zellen; zusätzlich exprimiert auf Makrophagen und dendrit. Zellen	Kansas, G. S. et al., 1991, J. Immunol., 146, 2235	15 20
CD 45RO	Protein Tyrosin Phosphatase; Isoform spezifisch für Memory-T-Zellen	Smith, S. H. et al, 1986; Immunol. 58, 63	25
CD 54	ICAM-1; exprimiert auf aktivierten Lymphozyten	Knapp, W. B. et al., eds. 1989. Leucocyte Typing IV: white cell differentiation antigens. Oxford University Press, New York	30
CD 69	aktivierte Lymphozyten und Monozyten	Fiebig, H. et al., 1989. Allerg. Immunol. 29, 3.	35
CD 71	aktivierte Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen	Knapp, W. B. et al.; eds. 1989. Leucocyte typing IV: white cell differentiation antigens., Oxford University Press, New York.	40
CD 80	B7; aktivierte Lymphozyten	Valle, A. et al., 1990. Immunol. 69, 531.	45
HLA-DR	aktivierte Lymphozyten und Monozyten	Lampson, L., et al., 1980. J. Immunol., 125, 293.	50
HLA-DQ	aktivierte Lymphozyten und Monozyten	Knapp, W. B. et al., eds. 1989. Leucocyte typing IV: white cell differentiation antigens., Oxford University Press, New York.	55

Die mittels Ficollseparation gewonnenen PBMNC wurden in kaltem (4°C) Vollmedium auf eine Zellzahl von ca. 3×10^6 Z/ml eingestellt. Es erfolgte die Zugabe der monoklonalen Antikörper in einer Konzentration von 5–10 µg/ml. Anschließend wurde für ca. 30 Min. bei 4°C inkubiert. Die PBMNC wurden dann zuerst in Medium (RPMI/10% Humanserum), dann in PBS/0,5% RSA gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in Puffer resuspendiert (max. 10 Zellen in 80 µl). Anschließend wurden dialysierte und sterilfiltrierte Microbeads (Miltienyi) zugegeben (20 µl auf 10^7 Zellen bzw. 80 µl Zellsuspension) und 15 Minuten bei 6 bis 12°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und anschließend in gleichem (100 µl) Volumen Puffer wie zuvor resuspendiert.

Nun wurde die Trennsäule in den Separator gehängt (bei negativer Selektion mit Flow-Resistor). Die Trennsäule wurde mit 500 µl Puffer vorgespült und die gut resuspendierte Zellsuspension auf die Säule aufgetragen und langsam durchlaufen gelassen. Dann wurde mit 500 µl Puffer nachgespült. Beide Fraktionen wurden zur Negativfraktion vereinigt.

nigt.

Nun wurde der Flow-Resistor entfernt und die Säule zwei- bis dreimal mit jeweils 500 µl Puffer durchgespült. Die Säule wurde anschließend aus dem Separator genommen, auf ein steriles 15 ml Zellkultur-Röhrchen aufgesetzt und die markierte Zellfraktion mit 1 ml Puffer aus der Säule gedrückt. Dies ergab die Positivfraktion.

- 5 Positiv- und Negativfraktion wurden einmal mit Vollmedium gewaschen, in Vollmedium resuspendiert und anschließend in 96-Well Rundbodenplatten in verschiedenen Zellkonzentrationen verteilt. Falls sehr wenige (unter 20 000 PBMNC je Well) eingesetzt wurden, fügte man bestrahlte sogenannte Feederzellen zu. Dies waren PBMNC desselben Blutspenders, die mit 4000 rad bestrahlt wurden, um die Proliferation dieser Feederzellen zu unterbinden. Es wurden meistens Triplikate ohne Antigen (nur mit Medium) und mit Tetanustoxoid ('T') als Stimulationsantigen angesetzt. An-
- 10 schließend wurde 5 Tage bei 37°C/7% CO₂ inkubiert. Dann erfolgte ein Puls mit ³H-Thymidin für 16 Stunden. Die Zellen wurden anschließend über einen Filter abgesaugt und die eingebaute Radioaktivität mittels beta-Zähler direkt bestimmt. Die Auswertung erfolgte durch Ermittlung des Stimulationsindex (SI), der sich wie folgt definiert: cpm (counts per minute) in Anwesenheit von TT/cpm mit Medium.

- 15 Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen. In dieser Versuchsreihe wurden jeweils 10 000 PBMNC aus der Positivfraktion (P) oder der Negativfraktion (N) zusammen mit 100 000 bestrahlten unseparierten Feederzellen in den Stimulationstests eingesetzt.

Tabelle 1

20 Ergebnisse mit Positivmarkern für die Anreicherung von aktivierten bzw. Memory-T-Zellen

Zellfraktion	Mediumkontrolle					Tetanustoxoid									
	Einzelwerte					MW	Abw. (%)	Einzelwerte					MW	Abw. (%)	SI
25															
Serie 1															
30	unsepar. PBLs	437	458	366	420	9	1180	1895	1494	1523	19	3,6			
	<CD25> P	164	185	248	199	18		1622	1510	1566	4	7,9			
	<CD25> N	230	148	211	196	18	583	344	455	461	21	2,3			
35	<CD39> P	225	344	295	288	17	330	133	458	307	44	1,1			
	<CD39> N	158	184	231	191	16	447	512	518	492	7	2,6			
	<CD45RO> P	270	464	261	332	28	1323	978	994	1098	14	3,3			
40	<CD45RO> N	173	208	183	188	8	283	426	416	375	17	2,0			
	<CD54> P	245	189	191	208	12	886	1022	847	918	8	4,4			
	<CD54> N	214	244	221	226	6	466	565	348	460	19	2,0			
Serie 2															
45	unsepar. PBL	409	256	480	382	24	2386	2761	2742	2630	7	6,9			
	<CD69> P	241			241		1431			1431		5,9			
	<CD71> P	343	525	440	436	17	3865	4175	3634	3891	6	8,9			
	<CD80> P	291	309	448	349	20	2759	2524	2898	2727	6	7,8			
50	<HLA-DR> P	707	577	515	600	13	1351	2027	1329	1569	21	2,6			
	<HLA-DQ> P	579	364	230	391	37	2114	1798	1531	1814	13	4,6			

- Aus diesem Experiment ergeben sich die folgenden Schlußfolgerungen: Eine Positivselektion mit gegen CD25, CD71, CD54 oder CD80 gerichteten Antikörpern bringt eine Erhöhung des Stimulationsindex gegenüber unseparierten PBMNC. Eine relative Anreicherung der TT-reaktiven T-Zellen findet sich auch in der positiv selektionierten Fraktion mit den monoklonalen Antikörpern gegen CD4SR0 gegenüber der mit diesem Markern depletierten Zellpopulation.

- 55 Eine deutliche Verringerung der Stimulationsfähigkeit gegenüber 'T' findet sich in den Positivfraktionen, die über Markierung mit anti-HLA-DR- und anti-HLA-DQ-Antikörpern gewonnen wurden. Ein überraschendes Ergebnis wurde bei dem Separationsexperiment mit anti-CD39-Antikörpern beobachtet. Hier ergab sich ein höherer Stimulationsindex mit der Negativfraktion im Vergleich zur Positivfraktion. Dies war vor allem auch auf eine deutlich erniedrigte Spontanproliferation mit der Medienkontrolle zurückzuführen.

Beispiel 2

- 65 Untersuchung der Modulation der Immunreaktion durch Anwesenheit von monoklonalen Antikörpern gegen IL-2 Rezeptor (CD 25)

Aus Beispiel 1 geht zunächst hervor, daß die Positivselektion mit anti-CD25-Antikörpern zur stärksten Erhöhung des Stimulationsindex im Vergleich zu den unseparierten PBMNC führte. Um zu bestimmen, ob diese Stimulationserhöhung

antigenspezifisch ist, wurde folgender Versuch durchgeführt:

PBMNC wurden, wie unter Beispiel 1 beschrieben, mit anti-CD25-Antikörpern markiert. Die so mit monoklonalen Antikörpern beladenen Zellen wurden nicht weiter separiert, sondern direkt in einen Proliferationsassay wie unter 1 beschrieben, eingesetzt. Als Vergleich diente ein Kontrollansatz mit gleichen Zellzahlen an nicht markierten PBMNC.

Tabelle 2 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs.

Tabelle 2

Modulation der Immunreaktion durch anti IL-2 Rezeptor

unseparierte PBLs:	Kontrolle Einzelwerte		MW		Abw. [%]	Tetanustoxoid Einzelwerte			MW	Abw. [%]	SI
20.000/well	139	198	206	180	16,4	4046	3285	4041	3791	9,4	21,0
mit <CD25> markierte, unseparierte PBLs:											
20.000/well	192	253	213	219	11,5	8284	7529	8267	8020	4,3	36,6

Es ist zu erkennen, daß durch den monoklonalen Antikörper gegen den IL-2 Rezeptor die in vitro Immunantwort gegen TT positiv moduliert wird. Die Steigerung der Stimulation nach Positivselektion der PBMNC mit dem anti-CD25-Antikörper geht deshalb wahrscheinlich nicht auf eine Anreicherung der relevanten T-Zellpopulation zurück, sondern ist das Ergebnis einer Kostimulation über den gegen den IL-2 Rezeptor gerichteten Antikörper. Folglich konnte für eine Anreicherung der relevanten T-Zellsubpopulation nicht eine Positivselektion gewählt werden, da die an Zellrezeptoren gebundenen Antikörper entweder eine Positivmodulation (z. B. durch CD25) oder eine Negativmodulation (z. B. durch HLA-DR oder HLA-DQ) der T-Zellen in der nachfolgenden antigenspezifischen Stimulation bewirkten.

Beispiel 3

Stimulationsversuche mit PBMNC nach Entfernung von naiven t-Zellen bzw. Entfernung der CD39 positiven Zellpopulation

Es wurde nun versucht, durch eine Negativselektion die gewünschte antigenspezifische T-Zellpopulation anzureichern. Hierzu wurden naive und unreife T-Zellen über die Marker CD4SRA (Morimoto C. et al., 1985. J. Immunol. 184, 1508) und CD62L (Reinherz, E. L. et al., 1982. J. Immunol. 128, 4639) entfernt. Weiterhin wurde für die Negativselektion der bereits in Beispiel 1 identifizierte Marker CD39 eingesetzt, der eine mononukleäre Subpopulation von B-, T- und NK-Zellen erkennt, die eine unspezifische Aktivierung bzw. Proliferation verursacht.

Für dieses Experiment wurden erstmals PBMNC von IDDM-Patienten verwendet. Es wurde als Modellantigen weiterhin TT getestet, aber zusätzlich auch das IDDM-relevante Antigen GAD.

Die über Ficollseparation isolierten PBMNC wurden wie unter Beispiel 1 beschrieben mit anti-CD39-Antikörpern allein oder mit den Antikörper-Mischungen gegen CD39/CD62L bzw. CD39/CD45RA markiert. Die weitere Behandlung der Zellen verlief wie unter Beispiel 1 für die Negativseparation beschrieben.

Tabelle 3 zeigt das Ergebnis dieser Versuchsreihe.

Die Entfernung der CD39-Subpopulation alleine bewirkte in allen Fällen eine starke Abnahme der Proliferation mit der Medienkontrolle, bei den Patienten 27 und 31 aber auch in Anwesenheit des Antigens TT. Mit GAD war weder mit unseparierten PBL noch mit anti-CD39-Antikörpern depletierten Zellen eine Proliferation zu beobachten. Wurde zusätzlich mit anti-CD62L-Antikörpern depletiert, so war bei den Patienten 27 und 31 ein deutlicher Anstieg des Stimulationsindex gegenüber den beiden Antigenen GAD und TT zu beobachten. Als ideale Kombination für eine Steigerung des Stimulationsindex insbesondere gegen das Autoantigen GAD erwies sich die Kombination der anti-CD39-/anti-CD45RA-Antikörper. Es konnte eine hochsignifikante Steigerung der in vitro Stimulation mit GAD und mit TT beobachtet werden.

Somit wird mit der Kombination der anti-CD39-/anti-CD45RA-Antikörper die relevante PBMNC-Population optimal angereichert. Eine mögliche Markerkombination bildet jedoch auch das Antikörperpaar anti-CD39-/anti-CD62L-Antikörper.

Beispiel 4

Zellseparation mit Proben von Kontrollpersonen und Patienten im Vergleich

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Frage geklärt, ob die Depletion der CD39- und CD45RA-Subpopulation nicht den unerwünschten Effekt hat, daß auch bei Normalpersonen eine Steigerung der in vitro Proliferation gegen das Diabetes-relevante Autoantigen GAD erfolgt. Zu diesem Zweck wurde eine Serie von PBMNC verglichen. Da die Reaktionsfähigkeit von T-Zellen auf bestimmte Antigene stark vom HLA-Typus der PBMNC-Spender abhängt, wurden nur solche Kontrollpersonen verwendet, die ebenfalls die für Typ I Diabetiker charakteristischen HLA-Klasse II Suszeptibilitätsantigene experimentierten. Die Einzelergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Aus dieser Versuchsserie ergibt sich Folgendes:

DE 197 10 496 A 1

1. Nach Depletion von CD39- und CD45RA-Subpopulationen steigt bei der überwiegenden Mehrheit der Kontrollpersonen der Stimulationsindex gegenüber TT deutlich an. Dagegen sinkt bei der überwiegenden Mehrheit der Kontrollpersonen der SI gegenüber dem Autoantigen GAD.

5 2. Im Gegensatz dazu wird bei den untersuchten IDDM-Patienten nach Zelldepletion eine deutliche Steigerung des SI gegen GAD beobachtet.

3. Durch die Erniedrigung des SI gegenüber GAD bei der Kontrollgruppe und gleichzeitiger Erhöhung des SI bei den Patienten resultiert ein hochsignifikanter Unterschied in der GAD-Reaktivität dieser beiden Vergleichsgruppen. Somit bietet sich diese Methode als verbessertes Nachweissystem zur Diagnose der T-Zell vermittelten Reaktivität gegen das Autoantigen GAD an.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

TAB 16-1

Tabelle 3

Vergleich der Stimulation von unseparierten und separierten PBMC aus IDDM-Patienten mit GAD und TT als Antigene

³ H-Thymidin-Einbau	75 000 Z/well				150 000 Z/well			
	Kontr.	Abw.	GAD	Abw.	Kontr.	Abw.	GAD	Abw.
	MW	(%)	MW	(%)	MW	(%)	MW	(%)
				SI		SI		SI
Pat. 27								
PBLs	206	30	285	1,38	774	33,03	1025	30
<CD39> N	41	17	44	1,07	51	1,22	39	26
<CD39>/<CD62L> N	30	17	117	3,90	202	174	705	80
<CD39>/<CD45RA> N	57	29	489	8,58	245	184	1952	51
Pat. 31								
PBLs	2198	32	1678	0,76	3511	3,45	8558	2,44
<CD39> N	84	18	76	0,90	104	1,92	139	21
<CD39>/<CD62L> N	87	13	153	1,76	98	22,15	507	5,17
<CD39>/<CD45RA> N	310	42	984	3,17	1178	30,32	4553	16

Tabelle 4

Zellseparation mit PBMNC von Kontrollpersonen (KP) und Patienten (Pat.) im Vergleich

	HLA- DR	Kontr. MW	Abw. (%)	GAD MW	Abw. (%)	SI	TT MW	Abw. (%)	SI
5									
10	KP3 100 000 Z/well PBLs <CD39>/<CD45RA> N	3/4 2096 97	28 19	4955 102	20 8	2,36 1,05	38997 17623	11 16	18,61 182
15	KP15 100 000 Z/well PBLs <CD39>/<CD45RA> N	4/4 340 828	28 21	757 1186	56 18	2,23 1,43	17515 24251	2 4	51,51 29,29
20	KP71 150 000 Z/well PBLs <CD39>/<CD45RA> N	3/4 2111 544	10 48	4425 939	8 23	2,10 1,73	25599 8006	- 12	12,13 14,72
25	KP103 100 000 Z/well PBLs <CD39>/<CD45RA> N	3/4 11606 442	- 59	34749 688	- 54	2,99 1,56	76907 41185	- 87	6,63 93,18
30	Pat. 23 150 000 Z/well PBLs <CD39>/<CD45RA> N	4/11 1259 144	27 26	895 336	18 27	0,71 2,33	19580 7592	- 6	15,55 52,72
35	Pat. 67 100 000 Z/well PBLs <CD39>/<CD45RA> N	4/7 6789 613	32 38	6528 982	30 72	0,96 1,80	39932 29429	- 10	5,88 48,01
40	Pat. 72 150 000 Z/well PBLs <CD39>/<CD45RA> N	4/6 5585 2405	12 23	9440 6203	13 29	1,69 2,58	34693 36823	- 1	6,21 15,31
45	Pat. 75 100 000 Z/well PBLs <CD39>/<CD45RA> N	3/7 3170 1078	- -	1989 1044	- -	0,63 0,97	14700 -	- -	4,64 -
50	Pat. 81 100 000 Z/well PBLs <CD39>/<CD45RA> N	4/4 10167 296	- 36	6945 1273	38 49	0,68 4,30	31537 37181	- 10	3,10 125,61

Beispiel 5

Steigerung der in vitro Stimulation durch GAD nach Immunkomplexbildung mit MICA 4

5.1 Einleitung

- GAD-spezifische T-Zell-Linien können durch PBMNC von partiell HLA-identischen Spendern stimuliert werden, wenn diese PBMNC mit 10 µg/ml GAD gepulst worden sind. Durch Komplexierung der GAD durch GAD-spezifische humane monoklonale inselzellspezifische Antikörper (MICA) sollte die Immunogenität der GAD verstärkt werden. Es wurde erwartet, daß komplexierte GAD bereits in Konzentrationen unter 10 µg/ml stimulatorisch wirkt.
- Es wurde die Proliferation der T-Zell-Linie 40/2#38 (TCT, 40/2#38) in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an freier bzw. komplexierter GAD miteinander verglichen. Zur Komplexierung wurde der GAD-spezifische Antikörper MICA 4 verwendet (zur Nomenklatur und Charakteristik der Antikörper siehe Richter et al., 1992, PNAS, 89, 8467 sowie Offenlegungsschrift DE 41 29 849 A1). Dieser erkennt ein Konformationsepitop in der Mitte der GAD-Sequenz (Aminosäuren 309-440). Die GAD-Konzentration wurde zwischen 0,1 und 6,3 µg/ml variiert. Zur Komplexierung wurde jeweils MICA 4 in achtfachem molaren Überschuß zugegeben. Dieses Verhältnis hatte in Vorversuchen zu einer optimalen Steigerung der Stimulation geführt. Anstatt MICA 4 können auch andere, der unter Richter et al., (1992), PNAS, 89, 8467 beschriebenen inselzellspezifischen humanen monoklonalen Antikörper verwendet werden, z. B. MICA 3.

5.2 Versuchsdurchführung

Es wurde eine Mischung aus 12,5 µg/ml GAD und 118 µg/ml MICA 4 in RPMI/10% HS hergestellt. In dieser Mischung lag ein achtfacher molarer Überschuß an MICA gegenüber GAD vor. Als Vergleichsansatz diente eine GAD-Verdünnung ohne Antikörper (CGAD ebenfalls 12,5 µg/ml). Die beiden Ansätze wurden 2 Stunden bei 37°C, 7% CO₂ inkubiert und anschließend seriell verdünnt.

Von jeder Verdünnungsstufe wurden Duplikate angesetzt, für die 50 µl freie bzw. komplexierte GAD mit 50 µl PBMNC-Suspension (2×10^6 Z/ml) in den Wells einer 96-Well-Rundbodenplatte vereinigt wurden. Die GAD wurde dabei um den Faktor zwei verdünnt. Es resultierte eine PBMNC-Konzentration von 100 000 Zellen/Well. Nach einem dreistündigen Antigenpuls bei 37°C, 7% CO₂ wurden die Zellen einer Strahlung von 40 Gy ausgesetzt. Pro Well wurden schließlich 50 µl T-Zell-Suspension ($1,6 \times 10^5$ Z/ml) zugegeben, was in einer T-Zell-Konzentration von 8000 Zellen/Well resultierte.

Die Zellen wurden nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C, 7% CO₂ mit 1 µCi [³H]-Thymidin pro Well gepulst und nach weiteren 16 Stunden Inkubation über einen Filter abgesaugt. Die eingebaute Radioaktivität wurde mittels beta-Zähler direkt bestimmt. Sie wird als Maß für die Stimulation verwendet.

5.3 Ergebnis

Die für freie bzw. komplexierte GAD ermittelten Titrationskurven sind in Abb. 1 dargestellt. Während freie GAD in einer Konzentration von 0,4 µg/ml nicht stimulierend wirkt, kann in Gegenwart von 0,4 µg/ml komplexierter GAD schon eine beträchtliche Stimulation beobachtet werden. Auch bei den höheren getesteten GAD-Konzentrationen bewirkt die komplexierte GAD eine deutlich stärkere Stimulation als die freie GAD.

Um eine Stimulation der Stärke zu erreichen, die in Gegenwart von 6,3 oder 3,1 µg/ml freier GAD erreicht wird, reicht eine jeweils zehnmal geringere Konzentration an komplexierter GAD aus.

Durch Komplexierung mit MICA 4 wird also die zur Stimulation benötigte GAD-Konzentration verringert. Bei einer gegebenen Konzentration bewirkt komplexierte GAD eine stärkere Stimulation als freie GAD.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer an antigenspezifischen T-Zellen angereicherten Zellpopulation, **dadurch gekennzeichnet**, daß man aus einer mononukleären Population von Zellen durch spezifische Abreicherungs-schritte
 - a) naive T-Zellen und
 - b) eine Subpopulation von B-, T- oder/ und NK-Zellen, die eine unspezifische Aktivierung oder/und Proliferation bewirken, entfernt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Entfernung der naiven T-Zellen Antikörper gegen CD4SRA oder/und CD62L verwendet.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Entfernung der Subpopulation von B-, T- oder/und NK-Zellen Antikörper gegen CD39 verwendet.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Zellpopulation herstellt, die an Memory-T-Zellen und in vivo präaktivierten T-Zellen angereichert ist.
5. Angereicherte Zellpopulation erhältlich durch das Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4.
6. Zellpopulation nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Gehalt $\geq 80\%$ an Memory-T-Zellen und in vivo präaktivierten T-Zellen enthält.
7. Zellpopulation nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Gehalt $\leq 10\%$ an naiven T-Zellen enthält.
8. Verwendung der Zellpopulation gemäß einem der Ansprüche 5 bis 7 in der Diagnostik.
9. Verwendung nach Anspruch 8 in einem Verfahren zum Nachweis der T-Zellreaktion gegen ein spezifisches Antigen.
10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das spezifische Antigen ein Autoantigen, Tumorantigen oder/und Pathogen ist.
11. Verwendung nach Anspruch 9 zum Nachweis von Diabetes, dadurch gekennzeichnet, daß das Antigen ein Autoantigen ist, welches humane GAD oder Fragmente davon umfaßt.
12. Verwendung der Zellpopulation gemäß einem der Ansprüche 5 bis 7 in einem Verfahren zur Kontrolle eines Vakzinierungserfolges.
13. Verwendung der Zellpopulation gemäß einem der Ansprüche 5 bis 7 in einem Verfahren zur Kontrolle der Verringerung der antigenspezifischen T-Zellen.
14. Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Antigen ein Tetanustoxoid ist.
15. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß man das Antigen als Immunkomplex gebunden an einen Antikörper einsetzt.
16. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper ein humaner Antikörper ist.
17. Verwendung der Zellpopulation gemäß einem der Ansprüche 5 bis 7 zur Herstellung eines therapeutischen Mittels.
18. Testkit für ein Verfahren zum Nachweis der antigenspezifischen Reaktivität von T-Zellen, umfassend
 - a) ein Reagenz zur Entfernung von naiven T-Zellen,
 - b) ein Reagenz zur Entfernung einer Subpopulation von B-, T- oder/und NK-Zellen, die eine unspezifische Aktivierung oder/und Proliferation bewirkt, und
 - c) Reagenzien zur Durchführung eines Assays zum Nachweis antigenspezifischer T-Zellen.
19. Testkit nach Anspruch 18 dadurch gekennzeichnet, daß das Reagenz zur Entfernung von naiven T-Zellen Anti-

körper gegen CD4SRA oder/und CD62L umfaßt.

20. Testkit nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß das Reagenz zur Entfernung einer Subpopulation von B-, T- oder/und NK-Zellen Antikörper gegen CD39 umfaßt.

21. Testkit nach einem der Ansprüche 18 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß er Autoantigene, Tumorantigene, oder/und Pathogene umfaßt.

22. Testkit nach einem der Ansprüche 18 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß er humane GAD oder/und Fragmente davon umfaßt.

23. Testkit nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß das GAD-Antigen im Komplex mit einem Antikörper vorliegt.

24. Testkit nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper ein humaner Antikörper gegen GAD ist.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

15

20

25

30

35

40

45

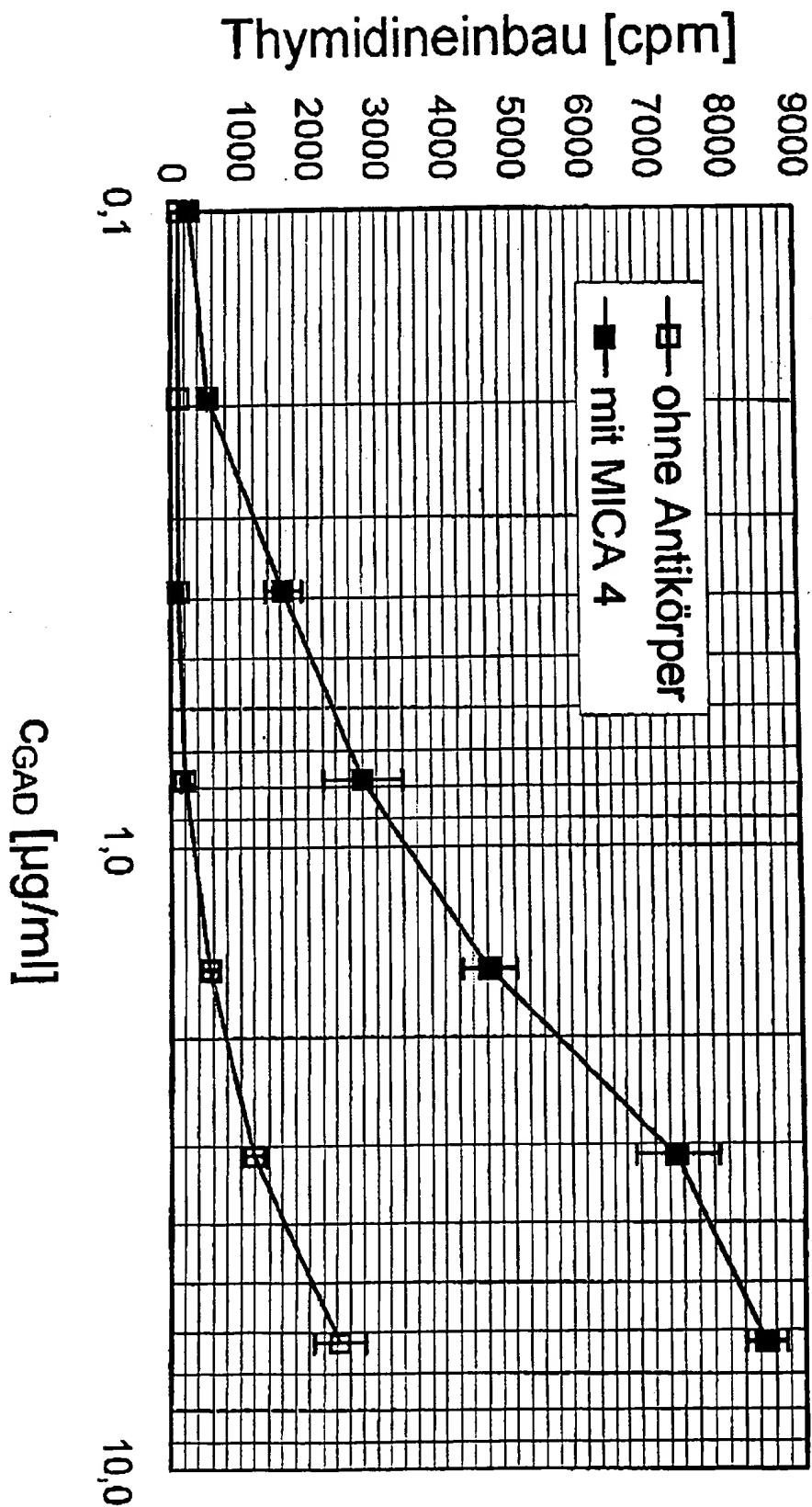
50

55

60

65

Abb. 1: Stimulation der TCL 40/2#38 durch freie bzw. durch mit MICA 4 komplexierte GAD



- Leerseite -